

Untersuchungen zur nachhaltigen
hyaluronidasehemmenden Wirkung
langdauernder Acetylsalicylsäuregaben

von

MARIA PROBST

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur nachhaltigen hyaluronidasehemmenden
Wirkung langdauernder Acetylsalicylsäuregaben

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maria Probst

aus

Straubing

1959



5349/60.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. ~~K. Kella~~ *H. Schwegk*

Tag der mündlichen Prüfung: *5.11.59*

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	5
Methodik	5
Versuchsreihen	6
Berechnung der Hemmung	9
Statistische Auswertung	9
Diskussion	15
Zusammenfassung	16
Tabellen	18
Literaturverzeichnis	24



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0025

Problematik

M a t h i e s ^{1,2} und J a n k o w s k i ³ haben in früheren Versuchen gezeigt, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Acetylsalicylsäure bei adrenaletomierten Ratten ausbleibt, dagegen bei hypophysektomierten Tieren erhalten ist. Diese Versuchsergebnisse besagen, daß die Nebenniere für das Zustandekommen der hyaluronidasehemmenden Wirkung erforderlich ist. Nach Untersuchungen von D o m e n j o z ⁴ tritt die Ascorbinsäureabnahme in der Nebenniere nach hyaluronidasehemmenden Substanzen bei hypophysektomierten Ratten im Gegensatz zu intakten Tieren nicht ein. Da die Ascorbinsäuredepletion nach S a y e r s u. S a y e r s ⁵ als Ausdruck der inkretorischen Funktion der Nebennierenrinde anzusehen ist, kann gefolgert werden, daß bei hypophysektomierten Ratten eine Aktivierung der Nebennierenrinde durch hyaluronidasehemmende Substanzen nicht auftritt. Da nach oben genannten Versuchen von M a t h i e s ^{1,2} und J a n k o w s k i ³ aber die hyaluronidasehemmende Wirkung der Acetylsalicylsäure bei hypophysektomierten Ratten erhalten ist, kann eine inkretorische Funktion der Nebennierenrinde nicht für das Zustandekommen der hyaluronidasehemmenden Wirkung der Acetylsalicylsäure verantwortlich gemacht werden. Diese Tatsache gilt nach weiteren Versuchen von M a t h i e s ⁶⁻⁹ und Mitarbeitern ¹⁰⁻¹³ an Phenylbutazon, Prednisolon, Chloraethylbenzmethoxazon und Moorbädern anscheinend für alle in vivo hyaluronidasehemmenden Substanzen. Es blieb demnach anzunehmen, daß nicht die inkretorische Funktion der Nebennierenrinde, sondern die des Nebennierenmarkes für den hyaluronidasehemmenden Effekt entsprechend wirksamer Substanzen verantwortlich gemacht werden muß. Diese Annahme wurde durch weitere Versuche von M a t h i e s ¹⁴ und S c h e u f e l e ¹⁵ gestützt, nach denen sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung hervorrufen. Ferner haben M a t h i e s ¹⁶ und Mitarbeiter ¹⁷⁻²⁰ zeigen können, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Nebennierenmarkkatecholamine durch Ergotamin-tartrat als Adrenolytikum blockierbar ist. Da die Hyaluronidasehemmung auch durch Natriumsalicylat, Prednisolon, Oestronsulfat und Moorbäder

blockiert werden kann, wenn vorher Ergotamintartrat injiziert wird, machen diese Versuche eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark als Vorbedingung für einen hyaluronidasehemmenden Effekt weiter wahrscheinlich.

Untersuchungen von Schwanck²¹, Fumy²², Esper²³ und Haupt²⁴ haben erkennen lassen, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung von Chloraethylbenzmethoxazon, Chloroquin, Oestransulfat und Moorbädern noch über lange Zeit erhalten blieb, wenn eine länger dauernde Applikation der hyaluronidasehemmenden Stoffe erfolgt. Es sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Verhältnisse nach einer länger dauernden Acetylcalicysäure-Applikation vorliegen und vor allem auch, ob bei einer etwaigen anhaltenden Hyaluronidasehemmung diese noch durch Ergotamintartrat ausgelöscht wird, oder ob ein selbständiger Effekt in Gang gesetzt wird.

Eigene Versuche

Methodik

30 männliche, weiße Ratten im Gewicht von 135 bis 168 g wurden für die Versuche verwendet. Die Tiere wurden mit Evipan-Natrium narkotisiert (30 mg Evipan-Natrium/100 g Tier s.c.), wobei nach Wilhelmi²⁷ kein störender Einfluß auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht. Die Hyaluronidasehemmung wurde durch Anwendung eines Spreading-Testes gemessen und errechnet.

Es wurde vor Beginn der Versuchsreihe und in bestimmten Abständen nach jeweiliger oraler Gabe der auf ihre Hyaluronidasehemmung zu prüfende Substanz je 2 intracutane Quaddeln von 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblau-Lösung und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurde eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin), enthaltend 150 IE in 2 ccm der oben genannten Evansblau-Lösung gelöst, so daß bei der Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE zur Wirkung kamen. Das Setzen der Quaddeln erfolgte streng intracutan mit einer dünnen Kanüle in die am schonendsten mit Pilca enthaarte Bauchhaut. Es wurde die Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes an der nach 10 Minuten nach der Quaddelinjektion erreichten Ausbreitung registriert, indem die Konturen auf einen Zelluloidstreifen übertragen und planimetrisch ausgemessen wurden. Nach Madinaveitia²⁸ verläuft das Spreading zweiphasisch und lediglich die innerhalb der ersten 10 Minuten ablaufende Reaktion ist sicher

ein echter Effekt der Hyaluronidase. Nach G i b i a n ²⁹ beruht die durch Hyaluronidase verstärkte aktive Diffusion einer intracutanen Quaddel auf dem Druck, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Nach Ablauf der ersten 10 Minuten dürften dann Resorptionsmechanismen im Vordergrund stehen. Die Tiere wurden vor jedem Quaddelversuch gewogen.

Acetylsalicylsäure (Aspirin) wurde oral durch die Schlundsonde verabreicht. Die Dosis betrug anfangs 20 mg/100 g Tier, später 10 mg/100 g, da sich die Anfangsdosis als unverträglich erwies und von den 30 in Versuch genommenen Tieren 15 eingingen. Aus diesem Grunde wurde auch der Versuch am 17.4. nicht verwertet. Vor den einzelnen Versuchen wurde ein behandlungsfreier Tag eingelegt, desgleichen erschien ein behandlungsfreier Tag vor der Verringerung der Dosis notwendig, um den noch überlebenden Tieren eine Erholung zu gestatten. Insgesamt wurde einschließlich der notwendigen Behandlungspausen die Acetylsalicylsäure über 86 Tage verabreicht. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 1 übersichtlich dargestellt. Aus ihr ergeben sich die jeweilige Dosis, die Applikationsdauer, sowie die Tage, an denen die Hyaluronidasehemmung bestimmt wurde.

Versuchsreihen

Leerversuch am 14.3.58

Es wurden 30 Ratten nach oben angegebener Methode je 2 Farbstoff- und Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten gemessen. Die Ergebnisse (Tabelle 1, 5 und 6) lieferten die Ausgangswerte, auf die die Resultate der folgenden Versuchsreihen bezogen wurden.

Bestimmung am 17.4.58

Aus oben angegebenen Gründen standen nur noch 15 Tiere für die Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität zur Verfügung, die sich in schlechtem Zustand befanden. Aus diesem Grunde wurden die uneinheitlichen Ergebnisse dieser Versuchsreihe nicht verwertet.

Versuch I. Bestimmung am 19.5.58

Für diesen Versuch standen noch 11 Tiere zur Verfügung. 4 Tiere waren als Verlust zu verbuchen, der nicht durch die Toxizität der Aspirindosis entstanden war. Die Ergebnisse, die bei der Auswertung nur bei den 9 insgesamt überlebenden Tieren berücksichtigt wurden, sind aus

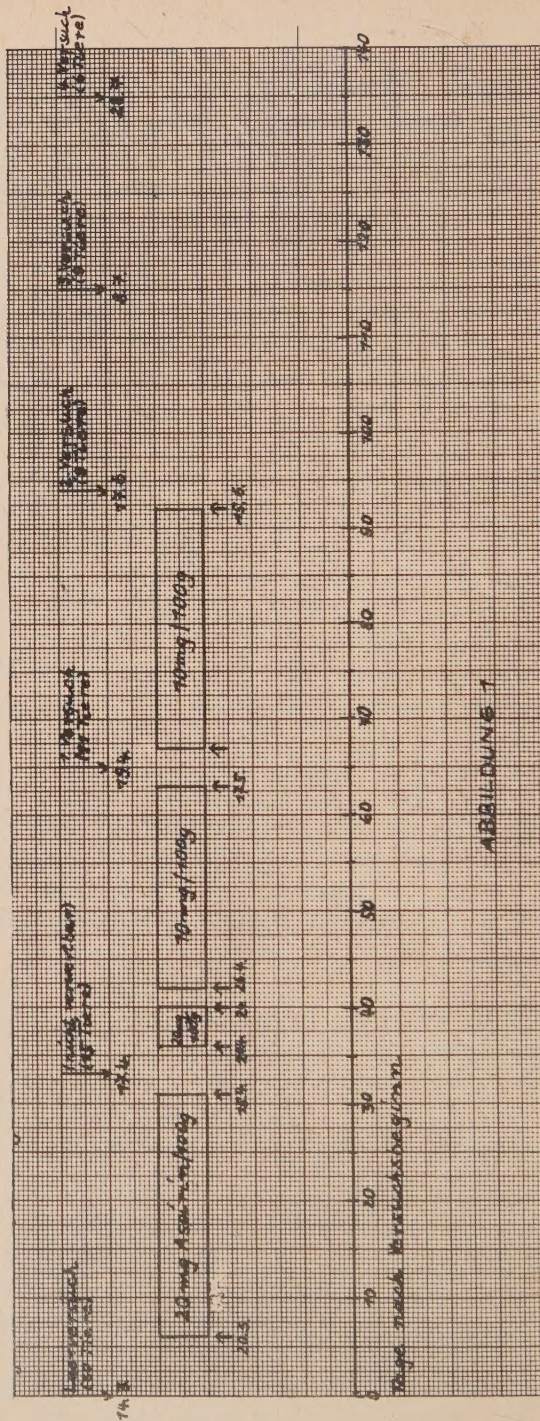


Tabelle 1, 5 und 6 zu ersehen. Sie zeigen, daß eine Hyaluronidasehemmung von 49,9%, die mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit zu sichern sind, während der oralen Dauerbehandlung mit Acetylsalicylsäure aufgetreten ist.

Versuch II, Bestimmung am 17.6.58

Nach einem weiteren Ausfall von 2 Tieren wurde die Hyaluronidaseaktivität nach Abschluß der oralen Acetylsalicylsäure-Behandlung festgestellt. Die Ergebnisse in Tabelle 1, 5 und 6 zeigen einen Anstieg der Hyaluronidasehemmung auf 73,1%. Dieser Wert konnte statistisch mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit gesichert werden.

Versuch III, Bestimmung am 8.7.58

Zur Auswertung standen die gleichen 9 Tiere wie beim II. Versuch zur Verfügung. Es wurde die Hyaluronidasehemmung etwa 3 Wochen nach Beendigung der oralen Dauermedikation mit Acetylsalicylsäure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1, 5 und 6 dargestellt. Es konnte nach dem etwa dreiwöchentlichen behandlungsfreien Intervall noch eine Hyaluronidasehemmung von 54,9%, die statistisch mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% belastet sind, festgestellt werden. Die Hemmung ist gegenüber dem II. Versuch (bei Abschluß einer etwa zwölfwöchigen Aspirinbehandlung) zwar etwas abgesunken, liegt aber immer noch in der gleichen Größenordnung gegenüber dem Wert des I. Versuches (nach etwa achtwöchiger Aspirinmedikation).

Versuch IV, Bestimmung am 28.7.58

3 Tiere, die für einen anderweitigen Versuch abgezwiegt wurden, fielen für die Bestimmung dieses Versuches aus, so daß 6 Tiere verwertet werden konnten. Es wurde zunächst die Hyaluronidasehemmung nach oben angegebener Methode nach etwa 6 Wochen nach Abschluß der oralen Aspirinmedikation bestimmt, die mit 36,7% (5% Irrtumswahrscheinlichkeit) weiter etwas zurückgegangen ist, aber noch sichere Werte erkennen läßt (Versuch IVa). Anschließend wurde den gleichen Tieren 0,8 mg Ergotamin tartrat (Gynergen)/100 g Tier subcutan injiziert und nach Ablauf von 30 Minuten erneut die Hyaluronidasehemmung ermittelt. Diese ist mit einem statistisch nicht zu sichernden Wert von 3,8% nicht mehr feststellbar (Versuch IVb). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 6 dargestellt. Gleichzeitig wurde eine erneute Auswertung dieser 6 Tie-

re auch für die Versuche I-III vorgenommen, um eindeutige Vergleiche der Verhältnisse zu ermöglichen. Diese Auswertungsergebnisse sind in Tabelle 2 und 8 berücksichtigt und zeigen keine wesentliche Abweichung gegenüber den Ergebnissen des jeweiligen Gesamtkollektivs, aus denen die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen errechnet wurden.

Versuch V (Vergleichsversuche mit unbehandelten Ratten)

Vergleichsweise wurde an 12 unbehandelten Ratten, die Hyaluronidase-aktivität mit gleicher Methodik zu Beginn und nach 4 und 8 Wochen bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle zeigen, daß erwartungsgemäß eine Veränderung nicht eintritt und daß die Tiere trotz einer Gewichtszunahme von $132 \pm 5,6$ keine Abweichungen der Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes zeigen. Für die Beurteilung der Ergebnisse ist damit die Gewichts- bzw. Größenzunahme der Tiere unerheblich. Da im Verlauf unserer Acetylsalicylsäureversuche die Tiere ebenfalls naturgemäß an Größe und Gewicht zunahmen, erscheint diese Feststellung wesentlich.

Berechnung der prozentualen Hemmung

Die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel im Leerversuch vor Beginn der Medikation wurde einer 100%igen Hyaluronidasehemmung gleichgesetzt, da eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität die gleiche Ausbreitung ergeben müßte. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel im Leerversuch entspricht einer 0%igen Hyaluronidasehemmung, da eine hyaluronidasehemmende Wirkung durch eine entsprechend wirksame Substanz zu diesem Zeitpunkt noch nicht wirksam werden konnte. Auf diese Festpunkte wurde die Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel nach Einwirkung der Acetylsalicylsäure bezogen. Die Farbstoffquaddel nach Einwirkung der hyaluronidasehemmenden Substanz wurde bei der statistischen Berechnung verwertet um festzustellen, ob auch ein Effekt unspezifischer Natur wirksam wird.

Statistische Auswertung der Versuche 1-4

Zur Bestimmung des experimentellen Fehlers wurden die Quaddeln paarweise gesetzt, d.h. jeweils ein Paar reiner Farbstoffquaddeln und ein Paar Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln. Die Werte zusammengehöriger Quaddeln wurden als eine Doppelbestimmung aufgefaßt, und die Varianz zwischen diesen Doppelbestimmungen als eine Schätzung des experimentellen Fehlers. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um einen

um einen reinen experimentellen Fehler, vielmehr ist in diesem Fehler auch eine biologische Komponente enthalten. Notwendigerweise müssen die beiden Quaddeln an verschiedenen Stellen der Bauchhaut gesetzt werden, und es darf angenommen werden, daß die Permeabilität der Bauchhaut an verschiedenen Stellen verschieden groß ist. Die Abweichung zwischen den Werten einer Doppelbestimmung wird daher auch durch diese Unterschiede in der Permeabilität der Bauchhaut mit bestimmt. Wir behalten jedoch die Bezeichnung "experimenteller Fehler" bei, da einerseits die durch die Versuchstechnik bedingte Komponente dieses Fehlers sicherlich die biologische Komponente überwiegt, und andererseits die Bezeichnung "biologischer Fehler" zweckmäßigerweise auch auf einen anderen Fehlertypus angewandt wird, der sich im Verlaufe der statistischen Untersuchungen ergeben wird.

Wir möchten darauf hinweisen, daß für die statistische Auswertung nur die Ergebnisse solcher Tiere herangezogen wurden, die den Gesamtversuch überlebten. Bei den Langzeitversuchen mit Acetylsalicylsäure sind dies 9 Tiere, bei den Zusatzversuchen mit Gynergen 6 Tiere.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse nahmen wir auf Grund eines linearen statistischen Modells vor. Hierbei wird angenommen, daß der Betrag, um den sich die Farbstoff- bzw. die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel von einem Zeitpunkt zum anderen ändert, von dem jeweiligen Versuchstier unabhängig ist. Anders ausgedrückt bedeutet dieses, daß sich die Versuchstiere während des gesamten Versuchsablaufes um einen konstanten, nur von den Versuchstieren, jedoch nicht vom Versuchsablauf abhängigen Betrag unterscheiden. Entsprechend diesem linearen Modell, erfolgte die Auswertung der Versuchsergebnisse mit Hilfe von Varianz-Analysen, und zwar jeweils getrennt für die reine Farbstoffquaddel und für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel.

Das Ergebnis dieser Varianz-Analysen findet sich in den Tabellen 3 und 4, und zwar in den Tabellen 3 das Ergebnis für den reinen Langzeitversuch, in der Tabelle 4 das Ergebnis für den Langzeitversuch + Zusatzversuch mit Gynergen. Es bedeutet in diesen Tabellen

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der jeweiligen Varianz;
- SAQ: Summen-Abstands-Quadrat;
- MAQ: mittleres Abstands-Quadrat.

Das Ergebnis der Varianz-Analysen ist folgendermaßen zu interpretieren:

1. Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen ("experimenteller Fehler"):

Die in den Varianz-Analysen angegebene "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" ist wie aus der Gesamtheit aller Doppelbestimmungen gewonnene Schätzung der Varianz zwischen einem Paar von zusammengehörigen Quaddeln, d.h. die Schätzung des experimentellen Fehlers. Es zeigt sich, daß dieser experimentelle Fehler für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel wesentlich höher ist als für die reine Farbstoffquaddel. Da angenommen werden muß, daß die rein experimentellen Fehler bei beiden Quaddel-Typen annähernd gleich groß sind, dürfte sich hierin eine biologische Komponente äußern, die bewirkt, daß die Unterschiede in der Permeabilität der Bauchhaut sich bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel stärker bemerkbar machen als bei der reinen Farbstoffquaddel. Dieses ist nur eine Vermutung, statistisch zu beweisen ist dieser Sachverhalt nicht. Der experimentelle Fehler sagt nicht über die Unterschiede aus, die zwischen den Tieren hinsichtlich ihres Verhaltens während des Versuchsablaufes bestehen. Eine Schätzung dieser Unterschiede liefert die Wechselwirkung "Tiere - Zeiten", die angibt, in welcher Weise die gemessenen Werte von den Erwartungswerten der statistischen Modelle abweichen. Da keine bessere Schätzung der biologischen Variabilität zwischen den Tieren zur Verfügung steht, benutzten wir diese Wechselwirkung als eine Schätzung des Versuchsfehlers und legten sie den statistischen Prüfungen zugrunde.

2. Reine Farbstoffquaddel

In keinem Falle besitzt der Varianz-Quotient zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Wechselwirkung "Tiere - Zeiten" eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5% ist. Die statistische Analyse liefert somit keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß die Medikation irgendeinen Einfluß auf die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddeln ausübt. Es darf daher angenommen werden, daß die reinen Farbstoffquaddeln während des gesamten Versuchsablaufes eine annähernd konstante Größe besitzen.

3. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel besitzt in beiden Fällen der Varianz-Quotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Wechselwirkung "Tiere - Zeiten" eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die wesentlich kleiner als 0,1% ist. Es kann daher

als statistisch hochgesichert gelten, daß sich die Größe der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel im Verlaufe des Versuches wesentlich ändert. Falls hierfür keine anderen Ursachen geltend gemacht werden können, darf angenommen werden, daß dieses durch die Medikation bewirkt wird. Für diese Interpretation spricht das Ergebnis des Langzeitversuches mit unbehandelten Tieren.

Die Varianz-Analyse liefert nur eine generelle Aussage darüber, ob bei den einzelnen Quaddel-Typen im Verlaufe des Versuches Unterschiede hinsichtlich ihrer Größe auftreten, sie macht jedoch keine Aussage darüber, zwischen welchen Zeitpunkten speziell diese Unterschiede bestehen. Hierzu mußten wir einen Test durchführen, der es erlaubt, simultan mehrere Mittelwertsdifferenzen zu vergleichen. Ein solcher Test ist von Duncan entwickelt worden. In den Tabellen 5 und 6 sind die Mittelwerte $\bar{x}$ aller zu dem jeweiligen Zeitpunkt gemessener Werte angegeben. Auf Grund des linearen statistischen Modelles sind die Unterschiede zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten gehörigen Mittelwerten Schätzwerte 1. Näherung, für die Änderungen welche der betreffende Quaddel-Typus für alle Tiere von dem einen Zeitpunkt zum anderen erfährt. In der Spalte "Sicherung" der Tabellen 5 und 6 ist die mittels des Duncan-Testes ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben, mit der behauptet werden kann, daß die Änderung, welche die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel zu dem betreffenden Zeitpunkt gegenüber ihrem Ausgangswert erfahren hat, statistisch gesichert sei. In der Spalte "Hemmung" ist die in üblicher Weise aus der Größe dieser Änderung berechnete prozentuale Hemmung angegeben.

Die Tabelle 5 enthält außerdem für jeden Zeitpunkt die Größe der Varianz s^2 zwischen den zu diesem Zeitpunkt vorgenommenen Doppelbestimmungen, und außerdem die mittleren Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes aus einer solchen Doppelbestimmung. In der systematischen Abnahme dieses mittleren Fehlers dürfte im wesentlichen die zunehmende Beherrschung der experimentellen Technik zum Ausdruck kommen. Daß es sich hierbei um einen spezifischen Effekt des Versuches handelt, ist kaum anzunehmen. Es zeigt sich, daß bei ausreichender Beherrschung der experimentellen Technik, die Methode eine erstaunliche Genauigkeit aufweisen kann. Es sei noch darauf hingewiesen, daß bei dem Zusatzversuch keine Doppelbestimmungen vorgenommen wurden (es bestehen hier insofern Schwierigkeiten, da die Bauchhaut der Ratten zu klein ist, um hinreichend viel

Quaddeln setzen zu können). Es war daher auch nicht möglich, bei der Auswertung des Langzeitversuches + Zusatzversuch die Doppelbestimmungen zu berücksichtigen, die während des Langzeitversuches an den Versuchstieren vorgenommen wurden. Aus diesem Grunde wurden zunächst Langzeitversuche allein und anschließend Langzeitversuche + Zusatzversuch ausgewertet.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß für die Auswertung des reinen Langzeitversuches die Ergebnisse von 9 Tieren herangezogen wurden, während für die Auswertung des Langzeitversuches + Zusatzversuch nur das Ergebnis von 6 Tieren herangezogen werden konnte, die bereits hinsichtlich ihres Verhaltens im reinen Langzeitversuch in der 1. Auswertung berücksichtigt wurde. Das in der Auswertung von Langzeit- + Zusatzversuch enthaltene Ergebnis über den reinen Langzeitversuch dient nur zur Beurteilung des Ergebnisses des Zusatzversuches. Hier ist von Bedeutung, daß vor Gabe von Gynergen eine noch statistisch gesicherte Hyaluronidasehemmung vorlag, die nach der Medikation nicht mehr feststellbar war.

Statistische Auswertung des Versuches 5

Ziel der statistischen Analyse war es zu prüfen, ob die Ausbreitung beider Quaddeltypen über den gesamten Zeitraum des Versuches hinweg als konstant angesehen werden kann.

Der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein entsprechendes lineares Modell zugrundegelegt, wie es auch bei der Auswertung des Versuches über die Hyaluronidasehemmung bei Medikation zur Anwendung gelangte. Es war jedoch in diesem Falle nicht notwendig, die Farbstoffquaddel und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel getrennt zu behandeln, da die Prüfhypothese impliziert, daß die beiden Quaddeltypen sich vollkommen gleichartig verhalten.

Entsprechend dem zugrundegelegten linearen Modell, erfolgte die Auswertung mittels einer mehrfachen Varianz-Analyse. Die hierbei ermittelten Varianz-Komponenten der Gesamtvarianz, sowie die Zahl der ihnen zukommenden Freiheitsgrade sind in der Tabelle 7 in der üblichen Form zusammengestellt. Die Ergebnisse der Varianz-Analyse sind wie folgt zu interpretieren.

a) Der Mittelwert von 2 zusammengehörigen Einzelbestimmungen ist mit

einem mittleren Fehler behaftet, der sich aus der Varianz zwischen diesen beiden Einzelbestimmungen schätzen läßt. Eine genauere Schätzung dieses mittleren Fehlers erhält man, wenn man alle 72 Doppelbestimmungen berücksichtigt und annimmt, daß der mittlere Fehler innerhalb aller Doppelbestimmungen gleich ist. Eine unabhängig von der Varianz-Analyse durchgeführte Prüfung dieser Annahme mittels des Bartlett-Testes ergab, daß die Meßergebnisse dieser Annahme nicht widersprechen. Die in der Varianz-Analyse angegebene "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" stellt somit die beste, aus den Versuchsergebnissen zu gewinnende Schätzung der Varianz zwischen zusammengehörigen Einzelbestimmungen dar. Aus ihr ergibt sich als mittlerer Fehler des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Doppelbestimmung der Wert $\pm 3,5 \text{ mm}^2$. Als Vertrauensintervall von $\bar{x}$ folgt hieraus $\bar{x} \pm 7,05 \text{ mm}^2$.

- b) Die Abweichung der empirischen Ergebnisse von den Hypothesen, die dem linearen Modell zugrundeliegen, drücken sich in der Varianz-Analyse in den Wechselwirkungen "Tiere - Zeiten", "Tiere - Quaddeltypen", "Zeiten - Quaddeltypen" und der "Rest-Varianz" aus. Der Vergleich dieser Wechselwirkungen mit dem experimentellen Fehler (Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen) nach dem Varianz-Quotienten-Test, ergibt nur für die Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen einen Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$, dessen Größe nicht mehr als zufallsbedingt angesehen werden kann. (Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,1\%$). Die Änderungen welche die Quaddeln von einem Bestimmungszeitpunkt zum anderen erfahren, können somit als unabhängig vom Versuchstier und vom Typus der Quaddel angesehen werden. Dagegen ist der Unterschied zwischen den beiden Quaddeltypen wesentlich von dem jeweiligen Versuchstier abhängig.
- c) Die mittlere Änderung, welche die Größe der Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt, und die wie oben bemerkt, von den Versuchstieren und dem Typus der Quaddeln unabhängig ist, drückt sich in der "Varianz zwischen den Zeiten" aus. Diese ist zahlenmäßig wesentlich kleiner als der experimentelle Fehler, d.h. die Änderungen der Quaddelgrößen im Verlaufe des Versuches liegen vollkommen in dem Bereich des experimentellen Fehlers. Die vorliegenden Versuche berechtigen somit zu dem Schluß, daß sich im Verlaufe des Beobachtungszeitraums die Diffusionsgeschwindigkeit weder bei der Farbstoff- noch bei der

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel geändert haben.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses ist es vielleicht von Bedeutung zu bemerken, daß in dem gleichen Zeitraum die Tiere eine wesentliche Gewichtszunahme erfahren haben, deren Betrag im Mittel $132 \pm 5,6$ g betrug.

- d) Die gesicherte Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen bringt zum Ausdruck, daß der Unterschied zwischen der Größe der Farbstoff- und der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vom Versuchstier abhängig ist. Eine orientierende Untersuchung dieses Sachverhaltes durch Berechnung der Regression zwischen Farbstoffquaddeln und den Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln zeigt, daß der Unterschied zwischen den beiden Quaddeltypen annähernd linear mit der Größe der Farbstoffquaddel wächst. Eine eingehende Untersuchung wurde an dieser Stelle wegen des für diese Frage geringen Stichprobenumfanges unterlassen, und soll später, bei Vorliegen weiterer Beobachtungen, vorgenommen werden.

In Tabelle 8 ist für jeden Bestimmungszeitpunkt der Mittelwert $\bar{x}$, die Varianz s^2 zwischen zusammengehörigen Einzelmessungen und der sich hieraus ergebende mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes einer Doppelbestimmung angegeben. Der Vergleich der Varianzen s^2 mittels des Bartlett-Testes ergab bei $n = 5$ Freiheitsgraden einen Wert $\chi^2_{\text{emp}} = 3,035$, dem eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens 50% zukommt. Die Varianzen s^2 , welche die Größe des experimentellen Fehlers zum Ausdruck bringen, können daher als vom Zeitpunkt ihrer Bestimmung und vom Typus der Quaddeln unabhängig angesehen werden.

Diskussion

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß bei etwa achtwöchiger, täglicher oraler Applikation von Acetylsalicylsäure (Aspirin) nach einem behandlungsfreien Intervall von 1 Tag mit 49,9% bzw. 41,1% deutlich ist. Das Ausmaß der Hemmung nimmt nach zwölfwöchiger Applikation mit 73,1% bzw. 72,6% noch weiter zu. Nach einem behandlungsfreien Intervall von 3 Wochen nach zwölfwöchiger Aspirinbehandlung liegt die Hyaluronidasehemmung mit 54,9% bzw. 50,3% immer noch in der gleichen Größenordnung wie 24 Stunden nach achtwöchiger Fütterung. Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß die Abnahme der Hyaluronidasehemmung nach Ab-

setzen einer länger dauernden Aspirinmedikation außerordentlich gering ist. Ähnliche Ergebnisse fand Haupt²⁴ nach einer Moorbäderreihe von 4 Wochen Dauer, während nach Versuchen von Schwanck²¹ z.B. nach Chloraethylbenzmethoxazon der Rückgang der Hyaluronidasehemmung deutlich zu sein scheint. Auch 6 Wochen nach einer dreimonatigen Aspirinapplikation ist die Hyaluronidasehemmung mit 36,7% noch statistisch zu sichern. Wenn nach dem gleichen Zeitraum Ergotamintartrat subcutan appliziert wird, wird der hyaluronidasehemmende Späteeffekt augenblicklich blockiert. Nach den anfangs erwähnten Überlegungen ist es damit wahrscheinlich, daß die medikamentöse Nachwirkung weiterhin eine Nebennierenmarkfunktion darstellt, da, wie im Kurzversuch nach einmaliger Gabe eines Salicylates (Schmidt¹⁷) mit einem Adrenolytikum, die Hyaluronidasehemmung auch in ihrer Spätwirkung durch Ergotamintartrat aufgehoben wird. Die Vergleiche der gefundenen Werte zwischen achtwöchiger und zwölfwöchiger Aspirinapplikation lassen erkennen, daß bei langdauernder Medikation noch ein Wirkungszuwachs festgestellt werden kann. Dieses Verhalten wurde bei keinem der übrigen geprüften Substanzen (Chloroquin (Fumy²²), Chloraethylbenzmethoxazon (Schwanck²¹)) festgestellt. Im Falle des Chloraethylbenzmethoxazon entsteht nach den Versuchen von Schwanck²¹ eher der Eindruck, daß eine geringe Abnahme des hyaluronidasehemmenden Effektes bei fortdauernder Medikation möglich ist. Unberührt von diesen Ergebnissen bleibt der analgetische Effekt der Acetylsalicylsäure, der in seinen zeitlichen Abläufen sicher von der hyaluronidasehemmenden Wirkung abweicht. Nach der Ansicht mehrerer Autoren^{25,26} spielt die hyaluronidasehemmende Wirkung antirheumatischer Substanzen für die Behandlung des Rheumatismus eine nicht zu unterschätzende Rolle. Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, daß eine beachtenswerte Nachwirkung einer Acetylsalicylgabe hinsichtlich ihrer hyaluronidasehemmenden Wirkung besteht.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen der vorgelegten Arbeit zeigen, daß bei länger dauernder Acetylsalicylsäureapplikation die hyaluronidasehemmende Wirkung dieser Substanz weiter zunimmt und nach Absetzen der Medikation relativ langsam zurückgeht. Da der hyaluronidasehemmende Späteeffekt nach einem behandlungsfreien Intervall mit Ergotamintartrat als Adrenolytikum blockierbar ist, wird unter Berücksichtigung bereits vorliegen-

der Versuchsergebnisse angenommen, daß die Hyaluronidasehemmung durch Acetylsalicylsäure (Aspirin) über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark läuft, und zwar nicht nur nach einmaliger Gabe, sondern auch in der Nachwirkung auf eine länger dauernde Medikation.

T a b e l l e n

Leerversuch 14.3.58		Versuch I, 19.5.58		Versuch II, 17.6.58		Versuch III, 8.7.58		Versuch IV, 28.7.58		Farbst. Quaddel n. Gyn.	Farbst. +Hy. Qu. n. Gyn.	
Tier Nr.	Gew. in g	Farbst. +Hy. Qu.	Gew. in g	Farbst. +Hy. Qu.	Gew. in g	Farbst. +Hy. Qu.	Gew. in g	Farbst. +Hy. Qu. v. Gyn.	Gew. in g			Farbst. +Hy. Qu. v. Gyn.
54	150	151 140	280 255	148 137	215	184 201	139 128	159 169	260	142 147	187 205	
56	155	153 168	280 302	137 150	205	223 234	150 153	203 192	220	143 131	182 177	138
68	158	131 143	258 269	134 130	265	182 170	156 138	167 179	270	146 148	165 165	280
77	148	119 116	246 266	148 135	255	213 188	137 135	158 160	280	143 150	212 202	128
80	155	152 148	254 225	133 145	205	218 209	144 148	154 161	265	128 159	175 159	154
85	156	128 145	192 200	150 150	235	189 204	125 130	159 173	285	152 153	160 167	156
92	147	133 140	231 -	135 121	205	157 167	152 146	176 172	245	157 152	241 228	128
94	150	125 133	254 221	128 132	235	173 170	144 137	177 172	280	146 150	190 189	
96	145	131 115	242 242	159 156	225	219 213	145 143	164 168	255	140 144	208 208	137
									305	144	206	263

T a b e l l e 1

Tier Nr.	Versuch I, 19.3.58			Versuch II, 18.4.58			Versuch III, 16.5.58		
	Gew. in g	Farbstoff- Quaddel	Farbstoff+Hyase- Quaddel	Gew. in g	Farbstoff- Quaddel	Farbstoff+Hyase- Quaddel	Gew. in g	Farbstoff- Quaddel	Farbstoff+Hyase- Quaddel
1	132	131 139	256 260	182	145 135	261 251	240	150 133	260 251
2	140	126 128	243 234	252	136 125	247 243	325	140 -	251 243
3	138	138 130	246 242	205	135 127	253 245	245	137 134	240 233
4	150	131 140	258 263	242	138 130	250 253	328	140 135	255 251
5	148	125 134	231 222	206	130 130	227 235	258	133 129	230 239
6	152	127 130	235 229	227	128 138	236 240	305	134 130	236 227
7	160	139 136	254 252	245	138 -	249 239	332	146 137	243 250
8	149	124 119	220 228	210	128 130	228 235	240	128 123	231 221
9	142	143 139	245 240	188	136 133	237 241	230	140 144	239 241
10	125	156 158	258 264	235	149 148	260 266	285	146 138	262 258
11	145	157 148	267 268	235	146 147	254 259	263	153 152	270 261
12	153	120 127	220 -	222	122 129	213 208	260	127 128	220 229
13	135	140 138	253 250	177	132 130	250 268	250	135 139	254 244

T a b e l l e 2

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	8	821	103	-	-
Zwischen den Zeiten	3	558	186	-	-
Tiere - Zeiten	24	5.257	219		
Zwischen Doppelbest.	35	6.636	190		
Innerhalb Doppelbest.	36	1.501	42		
Gesamt-Varianz	71	8.137	115		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	8	9.645	1.205	1,40	-
Zwischen den Zeiten	3	61.644	20.548	23,84	0,1%
Tiere - Zeiten	24	20.703	862		
Zwischen Doppelbest.	35	91.992	1.628		
Innerhalb Doppelbest.	36	4.041	112		
Gesamt-Varianz	71	96.033	1.352		

T a b e l l e 3
(Versuche 1 - 3)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	5	882	176	-	-
Zwischen den Zeiten	5	371	74	-	-
Tiere - Zeiten	25	5.950	238		
Gesamt-Varianz	35	7.203	206		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	5	14.594	2.918	4,17	1,0%
Zwischen den Zeiten	5	57.041	11.408	16,32	0,1%
Tiere - Zeiten	25	17.483	699		
Gesamt-Varianz	35	89.118	2.546		

T a b e l l e 4
(Versuche 1 - 4)

	Versuch	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	Leer	137 249	65,2 273,3	5,7 11,7		
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	1	140 195	46,7 90,5	4,8 6,7	49,9%	1,0%
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	2	142 170	32,7 37,2	4,0 4,3	73,1%	1,0%
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	3	145 190	22,2 47,8	3,3 4,9	54,9%	1,0%

T a b e l l e 5
(Versuche 1 - 3)

	Versuch	$\bar{x}$	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	Leer	137 246		
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	1	143 203	41,1%	2,0%
Farbstoffquaddel Farbstoff+Hyasequad.	2	142 170	72,6%	1,0%
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	3	144 193	50,3%	1,0%
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	4a	141 207	36,7%	5,0%
Farbstoffquaddel Farbst.+Hyasequaddel	4b	140 249	3,8%	-

T a b e l l e 6
(Versuche 1 - 4)

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	11	11.420	1.038		0,1%
Zwischen den Zeiten	2	4	2		-
Zwischen den Quaddel-Typen	1	434.501	434.501		0,1%
Tiere - Zeiten	22	890	40	1,60	-
Tiere - Quaddel-Typen	11	1.499	136	5,44	0,1%
Zeiten - Quaddel-Typen	2	96	48	1,92	-
Rest-Varianz	22	565	26	1,00	-
Zwischen Doppelbestimmung	71	448.975	6.324		
Innerhalb Doppelbestimmung	72	1.802	25		
Gesamt-Varianz	143	450.777	3.152		

T a b e l l e 7
(Versuch 5)

	N	$\bar{x}$	s ²	s _x
Farbstoffquaddel	12	136	18,4	1,24
Farbst.+Hyasequaddel	12	247	16,4	1,17
Farbstoffquaddel	12	135	19,8	1,28
Farbst.+Hyasequaddel	12	247	36,1	1,73
Farbstoffquaddel	12	137	29,2	1,56
Farbst.+Hyasequaddel	12	245	30,1	1,58

T a b e l l e 8
(Versuch 5)

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: *Arzneim.-Forsch.* 8 (1958), 233
- 2) Mathies, H. u. Jankowski, A.: *Klin. Wschr.* 35 (1957), 892
- 3) Jankowski, A.: *Dissertation München* 1957
- 4) Domenjoz, R.: *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.* 225 (1955), 14
- 5) Sayers, G. u. Sayers, M.: *Endokrinologie* (Springfield) 40 (1947), 256
- 6) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 7) Mathies, H.: *Zschr. ges. exper. Med.* 131 (1959), 118
- 8) Mathies, H. u. Werther, G.v.: *Arzneim.-Forsch. im Druck*
- 9) Mathies, H.: *Zschr. f. Rheumaforsch.* 18 (1959), 205
- 10) Hartmann, M.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 11) Schlierf, G.: *Dissertation München* 1959
- 12) Gerson, U.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 13) Rösch, U.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 14) Mathies, H.: *Arch. internat. Pharmacodyn. et. Thér. im Druck*
- 15) Scheufele, R.: *Dissertation München* 1958
- 16) Mathies, H.: *Medicina experimentalis* eingereicht
- 17) Schmidt, D.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 18) Vogel, M.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 19) Poulantzas, J.: *Dissertation München* 1958
- 20) Lingnau, W.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 21) Schwank, M.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 22) Fumy, A.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 23) Esper, U.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 24) Haupt, E.: *Dissertation München in Vorbereitung*
- 25) Mathies, H.: *Med. Klin.* 52 (1957), 1676 (dort weitere Literatur)
- 26) Mathies, H.: *Fortschr. d. Med.* 74 (1956), 35
- 27) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz, R. (4)
- 28) Madinaveitia, J.: *Biochemic. J.* 32 (1938), 1806
- 29) Gibian, H.: *Erg. d. Enzymforsch.* 13 (1954), 1

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit. Die Statistik wurde freundlicherweise durch Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich durchgeführt. Die Versuchssubstanz Acetylsalicylsäure (Aspirin) wurde von den Farbenfabriken Bayer Leverkusen zur Verfügung gestellt.

Ich, Maria Probst, wurde am 3.5.1934 in Straubing /Donau als Tochter des Herrn Otto Probst, praktischer Arzt, und seiner Frau Maria Probst geb. Wagner geboren. Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule und anschließend 9 Jahre das Realgymnasium der Ursulinen in Straubing, wo ich im Juni 1953 Abitur machte. Von November 1953 an besuchte ich die Universität München und immatrikulierte mich an der medizinischen Fakultät. Im Winter 1956/57 und im Sommer 1957 war ich an der Universität Würzburg immatrikuliert und die darauffolgenden Semester bis jetzt Winter 1958/59 wieder in München. Mit der Bearbeitung meines Dissertations-Themas war ich vom April 1958 bis Februar 1959 beschäftigt. Ich legte mein medizinisches Staatsexamen am 1. Oktober 1959 ab.

